

文章编号:1000-5404(2013)14-1493-05

论著

## STIM1 在幼年和成年大鼠外伤性癫痫中的表达

肖淳, 王文, 石全红, 但炜, 唐兆华, 师艺峰, 李海涛, 谢延风 (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院神经外科)

**[摘要]** **目的** 探讨钙释放激活钙离子通道 (calcium release-activated calcium, CRAC) 关键蛋白 STIM1 在幼年和成年大鼠外伤性癫痫中的表达差异及意义。**方法** 取 SD 雄性幼年、成年大鼠各 94 只, 按照完全随机设计分为成年、幼年假手术组: 皮层注射生理盐水, 各 42 只; 成年、幼年模型组: 铁离子皮层注射外伤性癫痫模型, 各 52 只。建模后观察大鼠癫痫行为学表现; 分别于 6、24、72 h, 7、14、21、28 d 7 个时相点完全随机选取 6 只大鼠, 处死取伤灶周边皮层脑组织, 用实时荧光定量 PCR、Western blot 和免疫组织化学法分别检测 STIM1 的 mRNA 与蛋白的表达。**结果** 模型组成年、幼年大鼠均出现典型痫性发作, 幼鼠模型组建模成功率为 91.3%, 成鼠模型组建模成功率为 84% (定义 Racine 评分 3 分及以上为建模成功)。幼鼠模型组比成鼠模型组发作次数明显增多 ( $P < 0.05$ ), 每次发作持续时间显著延长 ( $P < 0.05$ ), 发作程度较重。建模后各组 STIM1 的 mRNA 和蛋白表达都有明显增高, 72 h 达高峰 ( $P < 0.05$ ), 但幼鼠与成鼠相比较, STIM1 的 mRNA 和蛋白在各时间点表达增高的趋势更加显著 ( $P < 0.05$ )。**结论** 幼鼠较成鼠更容易发生外伤性癫痫, STIM1 在幼鼠中较成鼠的表达也更高, 提示 STIM1 表达增加、CRAC 激活可能是幼鼠更易发生外伤性癫痫的机制之一。

**[关键词]** 外伤性癫痫; CRAC 通道; STIM1

**[中图分类号]** R341; R394.3; R742.1

**[文献标志码]** A

## Expression of STIM1 in young and adult rats with posttraumatic epilepsy

Xiao Chun, Wang Wen, Shi Quanhong, Dan Wei, Tang Zhaohua, Shi Yifeng, Li Haitao, Xie Yanfeng (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the differential expression of STIM1, a key molecule in calcium release-activated calcium (CRAC), and investigate its significance between young and adult rats with posttraumatic epilepsy. **Methods** SD male adult and young rats ( $n = 94$  for each age group) were randomized into sham-operation group (injected by normal saline into the cortex,  $n = 42$  for each age group) and model group (injected by  $FeCl_3$  into the cortex,  $n = 52$  for each age group). The behavioral changes of the sham-operation and model groups were carefully observed and evaluated by modified Racine stage. In 6, 24 and 72 h, and 7, 14, 21 and 28 d after the injection, the rats of different age groups were sacrificed for the cortex tissue around the injection site, with 6 rats randomly selected at each time point. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR), Western blotting and immunohistochemical assay were used to detect the expression of STIM1 at mRNA and protein levels. **Results** Epileptic seizure was found only in the model group of adult and young rats. In the models with epilepsy induced by  $FeCl_3$ , the achievement rate was 91.3% in the young rats, but only 84% in the adult rats (the definition of the successful model was rats with Racine score above 3). Compared with the model group of adult rats, the model group of young rats had significantly more epileptic seizures ( $P < 0.05$ ), and also had significantly stronger severity and longer duration of epileptic seizure ( $P < 0.05$ ). The expression of STIM1 at mRNA and protein levels was significantly stronger in the model group than in the sham-operation group ( $P < 0.05$ ) in each time point, and reached the highest level in 72 h ( $P < 0.05$ ), with that in the young rats significantly higher than in adult group at each time point. **Conclusion** Young rats are prone to posttraumatic epileptic seizures, and severer than adult rats. The expression of STIM1 is higher in young rats than in adult rats, suggesting that higher expression of STIM1 and activation of CRAC might be one of the pathogenesis that young rats are more common to have posttraumatic epileptic seizures.

**[基金项目]** 国家临床重点专科建设项目经费资助 ([2011]170); 重庆市卫生局课题 (2010-2-002)

**[通信作者]** 谢延风, 电话: (023)89011151, E-mail: xyf3058@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.011.html> (2013-04-10)

[Key words] posttraumatic epilepsy; calcium release-activated calcium channel; STIM1

Supported by the Project of Clinical Key-discipline Construction (2011-170) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-002). Corresponding author: Xie Yanfeng, Tel: 86-23-89011151, E-mail: xyf3058@163.com

外伤性癫痫 (posttraumatic epilepsy, PTE) 是继发于颅脑损伤后的发作性功能异常, 在颅脑损伤中高达 8.9% ~ 34%<sup>[1]</sup>, 幼年患者较成人发作率更高, 其中约半数后遗长期发作, 而转化为难治性癫痫<sup>[2-3]</sup>。Golden 等<sup>[4]</sup>应用 FeCl<sub>3</sub> 注射大鼠左侧感觉皮层, 成功建立了大鼠的外伤性癫痫模型, 并发现幼鼠较成鼠更易出现癫痫发作。钙通道通过神经元异常放电和胶质瘢痕形成在外伤性癫痫发病中扮演重要角色。而新近发现的钙离子释放激活钙离子通道 (calcium release-activated calcium, CRAC) 是位于兴奋性细胞和非兴奋性细胞质膜上的钙通道, Julius 等<sup>[5]</sup>发现它与慢性癫痫有密切的关系。STIM1 是 CRAC 通道的关键分子, STIM1 通过感受胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度变化从而实现 CRAC 通道的开启和关闭<sup>[6]</sup>。本实验通过大鼠皮层注射 FeCl<sub>3</sub> 构建大鼠和幼鼠外伤性癫痫模型, 对比分析成鼠和幼鼠痫性发作率及发作持续时间, 检测 STIM1 的 mRNA 与蛋白在幼鼠和成鼠中表达差异, 探讨其与幼年外伤性癫痫发作高的相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

100 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 溶液 (美国 Sigma 公司), 兔抗大鼠 STIM1 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司),  $\beta$ -肌动蛋白 (actin) 鼠多克隆抗体 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (中国北京中杉金桥公司), PCR 引物采用 TaqMan Primer Express 软件设计, 由北京六合华大基因科技公司合成, Trizol RNA 抽提试剂、SYBR Green PCR Master Mix 及逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)。

### 1.2 动物及分组

成年雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 2 月龄 94 只, 体质量 (200 ± 20) g; 幼年雄性 SD 大鼠 3 周龄 94 只, 体质量 (50 ± 10) g; 均由重庆医科大学实验动物中心提供。94 只成年大鼠按照完全随机设计分为假手术组 42 只, 模型组 52 只 (预留 10 只, 直至造模成功 42 只); 假手术组为皮层注射 pH 为 1.5 的生理盐水 5  $\mu$ L, 模型组皮层注射 100 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 5  $\mu$ L。94 只幼年大鼠分组与处理同成年大鼠。

### 1.3 外伤性癫痫模型制作

参照 Golden 等<sup>[4]</sup>的方法, 大鼠称量后以 3.5% 水合氯醛溶液 (1 mL/100 g) 腹腔注射麻醉并固定于立体定位仪上。备皮后, 沿中线剪开头皮约 3 cm, 双氧水清理皮下组织, 剥离头顶筋膜, 暴露颅骨, 在左侧颅骨冠状缝后 2 mm、矢状缝旁 1 mm 处用外科显微手术钻钻孔并用微量注射器将 5  $\mu$ L 浓度为 100 mmol/L、pH 值为 1.5 的 FeCl<sub>3</sub> 溶液在 5 min 内匀速注射到大鼠的感觉运动皮质区内, 进针深度 3 mm, 注射完后留滞针头 5 min。

### 1.4 外伤性癫痫模型的行为学观察及成功的判定

造模后连续 6 h 观察大鼠行为学变化, 以后每天均连续观察 6 h, 根据改良 Racine 评分法: 无任何癫痫发作行为记 0 分; 凝视发作记 1 分; 规律性点头或湿狗样抖动, 伴或不伴面部抽动记 2 分; 单侧前肢抖动记 3 分; 站立、双前肢抖动及持续性点头记 4 分; 双侧肢体颤动加重, 失去平衡跌倒而全身性强直阵挛性发作记 5 分; 发作衰竭导致死亡记 6 分。我们将 3 分及以上的行为学改变定义为癫痫发作, 并视为模型成功, 对造模不成功或死亡的大鼠剔除实验, 并通过随机抽样原则补齐大鼠并重新造模<sup>[7]</sup>。

### 1.5 标本采集

成鼠模型组按照癫痫发作后 6、24、72 h, 7、14、21、28 d 7 个时相点, 每个时相点 6 只, 用 3.5% 水合氯醛溶液 (1 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 迅速断头, 手术切取大鼠左大脑皮层注射区域标本, 每个标本分为 3 部分, 一部分以 4  $^{\circ}$ C PBS 缓冲液 100 mL 冲洗 3 次, 一部分以 DEPC 水 (1:1 000) 冲洗 3 次, 置入 -80  $^{\circ}$ C 冰箱内保存, 用于实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 和 Western blot 的检测; 一部分以 4% 多聚甲醛浸泡 24 h 后予石蜡包埋, 常温保存, 用于免疫组织化学的检测。成鼠假手术组处理同模型组。幼鼠分组与处理同成鼠。

### 1.6 Real-time PCR 检测

大鼠 STIM1 上游引物 5'-CTGGTGGAGAACTGCCTGAC-3', 下游引物 5'-GGCTAAGAGAATGGGAAGAATCC-3', 产物长度 299 bp, 将保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中的标本组织取出, Trizol 法提取细胞总 RNA, 微量分光光度计 (美国 Bio-Rad 公司) 检测 RNA 样品浓度 (光密度值) 及纯度 [D(260)/D(280) 值在 1.7 ~ 2.0 范围内] 并进行标化。用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 10  $\mu$ L 逆转录体系包括 2  $\mu$ L 10  $\times$  RT Buffer, 0.8  $\mu$ L 25  $\times$  dNTP mix, 2  $\mu$ L 10  $\times$  RT Random primers, 1  $\mu$ L multiscribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase, 3.2  $\mu$ L RNAase free ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ g 总 RNA。逆转录条件如下: 25  $^{\circ}$ C 10 min, 37  $^{\circ}$ C 120 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 保存于 -20  $^{\circ}$ C。以 cDNA 为模板,  $\beta$ -actin 为内参照进行实时定量 PCR 反应 (美国 Bio-Rad 公司的 iQ5 RT-PCR 仪)。反应条件如下: 50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 55  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。反应体系为 25  $\mu$ L。实时定量 PCR 结果采用 Ct 值比较相对定量法,  $\beta$ -actin 为内参照。数据计算步骤是: 用  $\Delta\Delta Ct$  来计算基因的表达水平, 计算公式如下: 实验组相对于对照组基因表达水平的倍数 =  $-\exp(-\Delta\Delta Ct)$ , 其中  $\Delta\Delta Ct$  = 实验组  $\Delta Ct$  - 对照组  $\Delta Ct$ ,  $\Delta Ct$  = 具体测定的基因 Ct 值 -  $\beta$ -actin 基因 Ct 值。

### 1.7 Western blot 法检测

提取总蛋白质, 并用 BCA 法检测蛋白质浓度并标化。以  $\beta$ -actin 为内参蛋白。蛋白样品加入变性缓冲液于沸水中煮 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min 后上样。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转至硝酸纤维素膜。于 5% 脱脂牛奶中 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜; 分别加入抗 STIM1 抗体 (1:200)、抗  $\beta$ -actin 抗

体(1:3 000)置于4℃孵育过夜;加入二抗(1:3 750)于37℃孵育1 h。化学发光法进行显色。蛋白定量采用Image J图像处理软件检测。

### 1.8 免疫组织化学法检测

取出石蜡块,行连续冠状切片,片厚5 μm,每个标本分别制备10张切片,随机取1张然后按照说明书采用S-P法进行染色。以PBS代替一抗作阴性对照。采用Image-Pro Plus 5.0图像分析系统对免疫组化结果进行扫描,半定量分析STIM1在假手术组和模型组皮层中的表达。每张切片取10个不同视野,分析每个视野阳性神经元平均光密度值(average optical density, AOD),求其算术平均值,经校正后得出每张切片的AOD。

### 1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件,以独立样本 $t$ 检验比较成鼠与幼鼠之间行为学及STIM1表达的差异;以方差分析比较模型组的各时间组之间STIM1表达的差异,两两比较用 $q$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 行为学观察

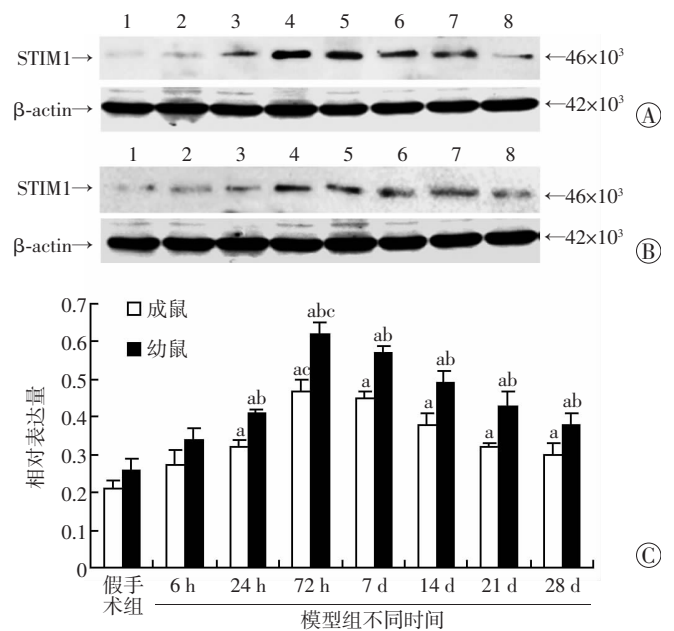
假手术组未见癫痫发作。模型组在麻醉清醒后表现为头向右偏,身体以尾根为圆心顺时针方向旋转,持续时间0.5~1 min。接近2 h时,大鼠开始出现程度不一的癫痫发作。如凝视、规律性点头或湿狗样抖动,伴或不伴面部抽动,单侧前肢抖动,站立、双前肢抖动及持续性点头,典型发作为身体向右后扭转,上半身抬起,接着整个身体背曲强直,四肢剧烈抽搐,幼鼠还可见翻转跳起,跳起时离地高度约20 cm,同时可见大鼠眼球向外凸出,并伴随出现尿失禁现象,幼鼠发作持续时间3~4 min,成鼠发作持续时间1~3 min。发作完毕后,大鼠侧卧在地,整个身体静止不动,出现瘫软现象,5~10 min后大鼠恢复正常活动。模型建立后2~6 h期间,成鼠每20~30分钟发作1次,幼鼠每15~20分钟发作1次。不论是成鼠还是幼鼠72 h内发作较为频繁,以后每天发作频率有所减少,但仍然可见典型发作。成鼠模型组痫性发作率为84.0%,幼鼠模型组痫性发作率为91.3%。每个时间点的幼鼠模型组比成鼠模型组平均发作次数明显增多( $P < 0.05$ ),持续时间显著增多( $P < 0.05$ ),且发作程度较重。见表1、2。

### 2.2 Real-time PCR 检测成鼠与幼鼠皮层 STIM1 mRNA 表达

成鼠模型组成模后各个时间点 STIM1 mRNA 表达与假手术组比较均显著增高( $P < 0.05$ ),72 h 组表达为最高峰( $P < 0.05$ )。幼鼠 STIM1 mRNA 表达情况相同。幼鼠模型组成模后各个时间点 STIM1 mRNA 表达均较成鼠显著性增高( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.3 Western blot 检测成鼠及幼鼠皮层 STIM1 蛋白表达

假手术组之间 STIM1 蛋白表达无统计学差异( $P > 0.05$ )。成鼠模型组成模后6 h STIM1 蛋白的表达与假手术组比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),余6个时间点的表达与假手术组比较均显著增高( $P < 0.05$ ),72 h 表达最高( $P < 0.05$ )。幼鼠成模后 STIM1 蛋白的表达趋势与成鼠相同,且幼鼠 STIM1 蛋白表达增高的趋势较成鼠更加显著( $P < 0.05$ )。见图1。



1:假手术组;2:模型组6 h;3:模型组24 h;4:模型组72 h;5:模型组7 d;6:模型组14 d;7:模型组21 d;8:模型组28 d A、B:幼鼠、成鼠Western blot检测结果;C:半定量分析结果 a:  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b:  $P < 0.05$ ,与成鼠比较;c:  $P < 0.05$ ,与其他时间点比较

图1 Western blot 检测各组大鼠大脑皮层 STIM1 蛋白的表达

表1 模型组大鼠不同时间平均痫性发作次数比较(次,  $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

种类	6 h	24 h	72 h	7 d	14 d	21 d	28 d
成鼠	10.83 ± 1.17 <sup>a</sup>	17.00 ± 1.41 <sup>a</sup>	28.00 ± 1.79 <sup>a</sup>	37.00 ± 2.37 <sup>a</sup>	44.50 ± 2.26 <sup>a</sup>	49.50 ± 2.74 <sup>a</sup>	52.33 ± 3.08 <sup>a</sup>
幼鼠	16.50 ± 1.05	22.67 ± 1.75	37.00 ± 2.28	46.17 ± 3.17	56.50 ± 2.35	61.17 ± 2.40	68.50 ± 2.66

a:  $P < 0.05$ ,与幼鼠比较

表2 模型组大鼠不同时间平均痫性发作持续时间比较( $t/\text{min}$ ,  $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

种类	6 h	24 h	72 h	7 d	14 d	21 d	28 d
成鼠	2.82 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.13 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.15 <sup>a</sup>
幼鼠	4.00 ± 0.09	4.00 ± 0.17	3.70 ± 0.14	2.75 ± 0.22	1.95 ± 0.10	1.78 ± 0.12	1.45 ± 0.10

a:  $P < 0.05$ ,与幼鼠比较

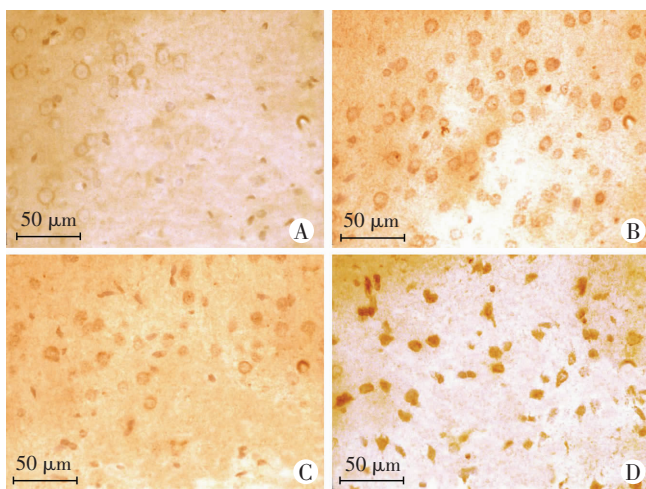
表3 外伤性癫痫成鼠及幼鼠皮层 STIM1 的 mRNA 表达水平 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

种类	假手术组	模型组						
		6 h	24 h	72 h	7 d	14 d	21 d	28 d
成鼠	1.00 ± 0.06	5.85 ± 0.39 <sup>ac</sup>	6.07 ± 0.17 <sup>ac</sup>	10.59 ± 0.80 <sup>abc</sup>	6.11 ± 0.28 <sup>ac</sup>	5.91 ± 0.25 <sup>ac</sup>	5.82 ± 0.37 <sup>ac</sup>	5.70 ± 0.45 <sup>ac</sup>
幼鼠	1.06 ± 0.03	8.62 ± 0.62 <sup>a</sup>	8.73 ± 0.73 <sup>a</sup>	17.80 ± 0.76 <sup>ab</sup>	9.40 ± 0.75 <sup>a</sup>	9.06 ± 0.30 <sup>a</sup>	8.70 ± 0.80 <sup>a</sup>	8.27 ± 0.73 <sup>a</sup>

a: P < 0.05, 与假手术组比较; b: P < 0.05, 与其他时间点比较; c: P < 0.05, 与幼鼠比较

## 2.4 免疫组织化学检测成鼠与幼鼠皮层 STIM1 的表达

在 STIM1 表达高峰时间点 (72 h), 取伤灶周边皮层做免疫组织化学法, 进一步测定其蛋白的表达变化。STIM1 在成鼠、幼鼠假手术组伤灶周边皮层神经元中仅有弱阳性表达, 棕色颗粒主要分布于细胞膜表面, 成鼠、幼鼠假手术组之间 STIM1 表达无统计学差异 (P > 0.05)。伤后 72 h, STIM1 在细胞膜表面的表达量与假手术组比较明显增加, 胞质可见少量棕色颗粒。与成鼠模型组相比较, 幼鼠模型组 STIM1 的表达显著性增高 (P < 0.05)。见图 2、表 4。



A: 成鼠假手术组; B: 成鼠模型组; C: 幼鼠假手术组; D: 幼鼠模型组  
图2 免疫组化观察成鼠及幼鼠的假手术组、模型组 STIM1 的表达 (S-P × 400)

表4 外伤性癫痫大鼠皮层 STIM1 阳性表达水平的比较 (AOD 值, n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

种类	假手术组	模型组
成鼠	0.158 ± 0.011	0.288 ± 0.016 <sup>a</sup>
幼鼠	0.172 ± 0.015	0.351 ± 0.011 <sup>ab</sup>

a: P < 0.05, 与假手术组比较; b: P < 0.05, 与成鼠比较

## 3 讨论

PTE 易转化为难治性癫痫<sup>[2-3]</sup>, 临床上幼年患者较成人发作率更高, 其发病机制及防治措施是目前国内外的研究热点和研究难点。文献报道外伤性癫痫主要以外伤后出血、血红蛋白分解产生的铁离子沉积为启动因素, 且皮层注射铁离子能够诱发动物痫样发作

及脑电图上癫痫样放电<sup>[8]</sup>, 因此皮层注射铁离子致痫模型已经作为动物外伤性癫痫模型<sup>[9]</sup>被广泛研究, 且目前已证实为一种可靠的能够模拟人类外伤后癫痫的动物模型<sup>[10]</sup>。

本实验在大鼠大脑皮层注射 FeCl<sub>3</sub>, 建立 FeCl<sub>3</sub> 外伤性癫痫模型, 观察痫样发作的行为学表现。结果显示成鼠模型组痫样发作率为 84.0%, 幼鼠模型组痫样发作率为 91.3%。且每个时间点幼鼠模型组比成鼠模型组发作次数都明显增多, 持续时间都显著延长, 发作程度也较重, 这与临床相似, 也与国外文献<sup>[4]</sup>报道一致。

同时, 我们也观测了钙释放激活钙离子通道 (calcium release-activated calcium, CRAC) 关键蛋白 STIM1 mRNA 和蛋白在外伤性癫痫中的表达变化。本研究发现模型组大鼠皮层的 STIM1 mRNA 和蛋白表达较假手术组均明显增高。众所周知过度的钙内流可致细胞毒性, 引发大量神经元同步放电, 而导致癫痫发生。Faria 等<sup>[11]</sup>在大鼠椎体神经元底切的外伤性癫痫模型中, 减少 N 型钙通道的钙离子内流, 抑制性冲动也较少地进入椎体细胞, 说明了外伤性癫痫与钙通道有密切的关系。Steinbeck 等<sup>[5]</sup>发现 CRAC 与慢性癫痫有密切的关系, 无镁溶液培养的神经元细胞用 CRAC 特异性阻断剂阻断后, 棘尖波的出现周期明显延长。钙离子释放激活钙通道 (calcium release-activated calcium, CRAC) 是位于细胞质膜上的慢钙通道, 对钙离子有较高选择性, 钙库中钙离子减少时可被激活。STIM1 与 CRAC 的通道激活密切相关。STIM1 是一种主要定位于内质网上的 I 型跨膜蛋白, 含有多个不连续的结构域, 包括 N 端信号肽、EF-hand 结构域、SAM 结构域, 单次跨膜片段, C 端螺旋卷曲结构域和 S/P 结构域等, CRAC 通道休眠的时候, STIM1 二聚体上的 EF-hand 结合有 Ca<sup>2+</sup>, 不能与 CRAC 通道相互作用, CRAC 通道处于关闭状态。铁离子致颅脑损伤后, 继发 Haber-Weiss 铁催化反应, 促使过氧化反应, 激活细胞膜磷脂酶 C (PLC), 作用于 PIP<sub>2</sub> 使其分解为 IP<sub>3</sub> 和二酰甘油 (DAG)。IP<sub>3</sub> 与 ER 上的 IP<sub>3</sub> 受体 (IP<sub>3</sub>R) 结合, 引起细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度轻微升高, 由此进一步引起更多 IP<sub>3</sub>R

通道的开放,大量的  $\text{Ca}^{2+}$  从内质网释放到细胞质,也就是所谓的  $\text{Ca}^{2+}$  诱导了  $\text{Ca}^{2+}$  的释放,内质网  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的降低,促使 STIM1 二聚体上的 EF-hand 失去  $\text{Ca}^{2+}$  而被激活,从而激活了 CRAC 通道<sup>[12-13]</sup>。因此,本研究结果提示伤后大鼠皮层中 STIM1 表达增高,CRAC 通道因此被过度激活,可导致胞内钙超载发生,从而最终诱发外伤性癫痫的发作。

临床上幼年患者较成人发作率更高,更易转化为难治性癫痫。因此,我们进一步研究了 CRAC 关键蛋白 STIM1 在幼年和成年大鼠外伤性癫痫中的表达差异。幼鼠较成鼠更易诱发外伤性癫痫的这一现象,国内外研究主要集中在氧化应激的机制上,氧化应激反应导致膜离子泵等一系列病理改变,最终诱发癫痫,抗氧化酶体系是随着大鼠的年龄增长而逐渐发育完善,所以抗氧化酶体系的相对缺失导致了幼鼠更易诱发外伤性癫痫<sup>[4]</sup>。但抗氧化酶的多少并不能完全解释这一现象,本研究及国内外文献的报道均说明了 STIM1 与癫痫的发生密切相关。有研究表明,幼鼠骨骼肌中 STIM1 的表达较成鼠明显增多<sup>[14]</sup>,但 STIM1 在大鼠皮层的表达是否与年龄具有一定的相关性目前尚不清楚。基于以上研究背景,本研究发现幼鼠伤后各时间点 STIM1 mRNA 和蛋白的表达较成鼠均显著性增高,提示幼鼠较成鼠更易诱发外伤性癫痫可能是与 STIM1 在成鼠和幼鼠中的差异性表达,从而影响了 CRAC 通道的活性相关。另外,有众多学者认为癫痫是一种免疫疾病,CRAC 通道在 T 淋巴细胞、树突状细胞中是发挥免疫递呈功能的关键信号转导通路<sup>[15]</sup>,STIM1 是一非常重要的免疫分子,STIM1 基因变异会导致中枢神经系统发育异常、先天性免疫功能缺陷等离子通道病<sup>[16]</sup>,从而推测由于 STIM1 表达的增高,影响了大鼠的免疫功能,而导致免疫功能较低的幼鼠更易诱发外伤性癫痫。

总之,幼鼠较成鼠更容易发生外伤性癫痫,STIM1 在幼鼠中较成鼠的表达也更高,提示 STIM1 表达增加、CRAC 通道激活可能是幼鼠更易发生外伤性癫痫的机制之一。我们有可能以此为切入点,发现幼儿外伤性癫痫发生的新机制,找到药物防治的新靶点,但调控外伤后 STIM1 表达变化的具体信号通路等机制仍需深入研究。

#### 参考文献:

[1] Kharatishvili I, Pitkanen A. Posttraumatic epilepsy[J]. *Curr Opin*

*Neurol*, 2010, 23(2): 183-188.

[2] Chen J W, Ruff R L, Eavey R, et al. Posttraumatic epilepsy and treatment[J]. *J Rehabil Res Dev*, 2009, 46(6): 685-696.

[3] Tellez-Zenteno J F, Hunter G, Wiebe S. Injuries in people with self-reported epilepsy: a population-based study[J]. *Epilepsia*, 2008, 49(6): 954-961.

[4] Golden N, Darmadipura S, Bagiada N A. The difference in seizure incidences between young and adult rats related to lipid peroxidation after intracortical injection of ferric chloride[J]. *Singapore Med J*, 2010, 51(2): 105-109.

[5] Steinbeck J A, Henke N, Opatz J, et al. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy[J]. *Exp Neurol*, 2011, 232(2): 185-194.

[6] Zhang S L, Yu Y, Roos J, et al. STIM1 is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor that activates CRAC channels and migrates from the  $\text{Ca}^{2+}$  store to the plasma membrane[J]. *Nature*, 2005, 437(7060): 902-905.

[7] 蒋国辉, 方升, 石全红, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶对皮层注射  $\text{FeCl}_3$  所致早期癫痫的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(24): 2579-2582.

[8] 陈敏若, 石全红, 谢延风, 等. 表皮生长因子对铁离子致痫大鼠脑的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(12): 1202-1205.

[9] Willmore L J, Sybert G W, Munson J B. Recurrent seizures induced by cortical iron injection: a model of posttraumatic epilepsy[J]. *Ann Neurol*, 1978, 4(4): 329-336.

[10] Pitkanen A, McIntosh T K. Animal models of post-traumatic epilepsy[J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(2): 241-261.

[11] Faria L C, Parada I, Prince D A. Interneuronal calcium channel abnormalities in posttraumatic epileptogenic neocortex[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(2): 821-828.

[12] Spassova M A, Soboloff J, He L P, et al. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(11): 4040-4045.

[13] Skibinska-Kijek A, Wisniewska M B, Gruszczynska-Biegala J, et al. Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2009, 69(4): 413-428.

[14] Edwards J N, Blackmore D G, Gilbert D F, et al. Store-operated calcium entry remains fully functional in aged mouse skeletal muscle despite a decline in STIM1 protein expression[J]. *Aging Cell*, 2011, 10(4): 675-685.

[15] Lioudyno M I, Kozak J A, Penna A, et al. Orail and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(6): 2011-2016.

[16] Feske S. CRAC channelopathies[J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(2): 417-435.

(收稿:2013-03-14;修回:2013-03-26)

(编辑 王小寒)